

02.3.2005

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出願年月日 2004年 2月20日  
Date of Application:

出願番号 特願2004-045488

Application Number:

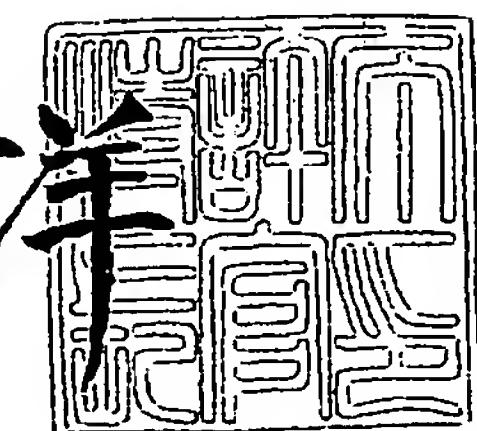
[ST. 10/C] : [JP2004-045488]

出願人 独立行政法人産業技術総合研究所  
学校法人近畿大学  
財団法人北九州産業学術推進機構  
Applicant(s):

2005年 2月22日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川洋



【書類名】 特許願  
【整理番号】 2004001540  
【提出日】 平成16年 2月20日  
【あて先】 特許庁長官 今井 康夫殿  
【国際特許分類】 C12N 15/11  
【発明者】  
【住所又は居所】 佐賀県鳥栖市宿町字野々下807番地1 独立行政法人産業技術  
総合研究所九州センター内  
【氏名】 大庭 英樹  
【発明者】  
【住所又は居所】 福岡県飯塚市柏の森11-6 近畿大学九州工学部内  
【氏名】 藤井 政幸  
【特許出願人】  
【識別番号】 301021533  
【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所  
【代表者】 吉川 弘之  
【特許出願人】  
【識別番号】 000125347  
【氏名又は名称】 学校法人近畿大学  
【代表者】 世耕 弘昭  
【特許出願人】  
【識別番号】 802000031  
【氏名又は名称】 財団法人北九州産業学術推進機構  
【代表者】 有馬 朗人  
【代理人】  
【識別番号】 100071825  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 阿形 明  
【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 033547  
【納付金額】 10,500円  
【その他】 国等以外の全ての者の持分の割合 50／100  
【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲

【請求項1】

核外移行シグナルペプチドで修飾された細胞質局在化DNA

【請求項2】

5'末端又は3'末端で核外移行シグナルペプチドにより修飾されている請求項1記載の細胞質局在化DNA。

【請求項3】

核外移行シグナルペプチドが、HIV-1 Rev (配列表配列番号1)、PKI $\alpha$  (配列表配列番号2)、DSK-1 (配列表配列番号3) 又はMAPKK (配列表配列番号4) である請求項1又は2記載の細胞質局在化DNA。

【請求項4】

DNAが遺伝子医薬作用を示すオリゴDNAである請求項1ないし3記載の細胞質局在化DNA。

【請求項5】

固相担体上において、DNAのフラグメントを活性水素含有基で修飾し、これに二官能性リンカーを介して活性水素含有基をもつ核外移行シグナルペプチドを縮合させたのち、固相担体から脱離させることを特徴とする細胞質局在化DNAの製造方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】細胞質局在化DNA及びその製造方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、DNAに各種タンパク質由来の核外移行シグナルペプチドを共有結合により導入することにより、その細胞質透過性を向上させ、かつ選択的に細胞質内に局在化させることを可能にした新規な細胞質局在化DNA及びその製造方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

生物の核内で作用するタンパク質には、細胞質から核へ運搬されるための標識となる部分、すなわち核局在化シグナルが存在しており、この核局在化シグナルは各種核タンパク質それぞれに特有のものである。そして、そのシグナルを認識して核タンパク質を細胞質から核まで輸送する因子が多数存在し、これによって生命維持のためのタンパク質の供給が行われている。

【0003】

一方、核外移行シグナル（以下NESと示す）と称される特異なアミノ酸配列を有するタンパク質は、輸送タンパク質と結合して核内から細胞質へ移行する。

このようにして、遺伝子を保管し、遺伝情報の発信を行っている核とタンパク質の合成を行い、かつ細胞外からの刺激を受け取る場となっている細胞質において常に情報交換することにより生物細胞は生命活動を継続している。

【0004】

ところで、最近、遺伝子（DNA又はRNA）に直接作用して病気の原因となっている遺伝子発現を抑制して疾病を治療する医薬、いわゆる遺伝子医薬が遺伝子情報の源流であるDNAやRNAに直接作用して疾病を根本的に治療し得るという点で注目を浴びるようになり、このようなものとして例えば肝細胞に特異的に遺伝子導入可能な糖修飾ペプチド誘導体を含むベクターとDNA又はアンチセンスDNAとからなる肝細胞特異的遺伝子医薬が提案されている（特許文献1参照）。

【0005】

この遺伝子医薬は、32615個という膨大な数の遺伝子のうちのただ1個を標的として作用する必要があるが、そのために30.7億対からなるヒトゲノム配列のただ1個所に選択的に結合する分子が必要であり、その機能をもつ短鎖DNA又はRNAいわゆるオリゴDNA又はオリゴRNAの医薬への利用が研究されるようになった。

【0006】

その結果、これまでに、DNAを標的とするアンチジーン法、mRNAを標的とするアンチセンス法、RNAを分解する機能をもつDNAを用いRNAを標的とするDNA酵素法、二本鎖RNAによるRNA干渉（RNAi）を利用したRNAを標的とするsiRNA法などが既に開発されている。そして、これら的方法は、いずれも医薬としての特性をもつオリゴDNA又はオリゴRNA分子の創製が重要な課題となっている。

【0007】

ところで、これらの遺伝子医薬の多くは、細胞内の細胞核よりも細胞質において、より高い効力を發揮することが知られているので、その細胞質における遺伝子医薬の局在化を実現することができれば、優れた遺伝子医薬が得られることになる筈であるが、これまでこのような遺伝子医薬は知られていない。

【0008】

【特許文献1】特開平11-290073号（特許請求の範囲その他）

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、由来する組織に関係なく、各種DNAに対して普遍的に適用することができる手段で、細胞質局在化を実現した修飾DNAを提供することを目的としてなされたもの

である。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、細胞質内に局在化可能なDNAを得るために種々研究を重ねた結果、細胞内に存在するタンパク質とRanGTPとコンプレックスを形成し、これを核から細胞質へ移行させるNESペプチドでDNA特にオリゴDNAを修飾すれば、DNAを細胞質に局在化し得ること、したがって、これを利用して遺伝子医薬例えばオリゴヌクレオチドとのコンジュゲート体を形成させれば、所望の遺伝子医薬を細胞質へ局在化させ効力を向上させ得ることを見出し、この知見に基づいて本発明をなすに至った。

【0011】

すなわち、本発明は、核外移行シグナルペプチド（以下NESペプチドと略記する）で修飾された細胞質局在化DNA、及び固相担体上において、DNAのフラグメントを活性水素含有基で修飾し、これに二官能性リンカーを介して活性水素含有基をもつ核外移行シグナルペプチドを縮合させたのち、固相担体から脱離させることを特徴とする細胞質局在化DNAの製造方法を提供するものである。

【0012】

本発明において、NESペプチドにより修飾されるべきDNAは、どのような由来のものでもよく、生体内の種々の組織から採取されたものの中から使用目的に応じて任意に選ぶことができるが、塩基配列数10～30程度のオリゴDNAが好ましい。

【0013】

次にNESペプチドとしては、例えばHIV-1 Rev（配列表配列番号1）、PKI $\alpha$ （配列表配列番号2）、DSK-1（配列表配列番号3）、MAPKK（配列表配列番号4）などが挙げられるが、それ以外のNESペプチドも用いることができる。

【0014】

このようなNESペプチドでDNAを修飾する方法としては、液相中で $\gamma$ -マレインイミドブチルオキシサクシンイミドをリンカーとして用いて縮合させる方法、液相中でヨードアセトキシサクシンイミドをリンカーとして用いて縮合させる方法、液相中でコンジュゲートする方法などが知られており、これらの中のいずれの方法を用いてもよいが、特に好適なのは、固相フラグメント縮合法である。

【0015】

この方法は、多孔性ガラス、制御多孔性ガラス（CPG）、ポリエチレングリコール／ポリスチレンのような固相担体上においてDNAのフラグメントの活性水素含有基、例えばアミノ基、カルボキシル基、チオール基、ヒドロキシル基に二官能性リンカーを反応させたのち、NESペプチドを縮合させることによって製造することができる。

【0016】

この際に用いる二官能性リンカーとしては、活性水素含有基と反応して安定な結合を形成しうる官能基2個を有する化合物が用いられる。

このような化合物としては、例えば以下の（イ）ないし（チ）に示す化合物が挙げられる。

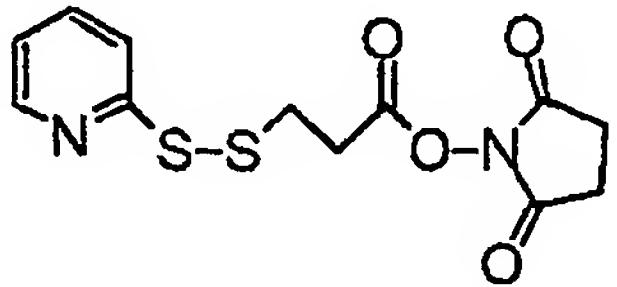
（イ）S-（2-ピリジルジチオ）システアミン

【化1】



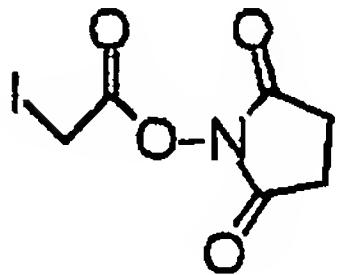
（ロ）N-スクシンイミジル=3-（2-ピリジルジチオ）プロピナート

【化2】



(ハ) ヨードアセトキシスクシンイミド

【化3】



(ニ) ジチオイソシアナトアルカン

SNC-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NCS

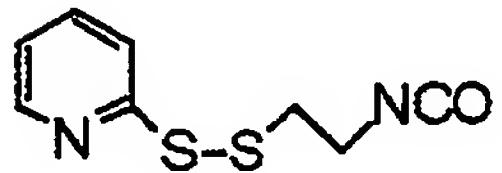
(ホ) ジイソシアナトアルカン

ONC-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NCO

(ただし n は 1 ~ 10 の整数)

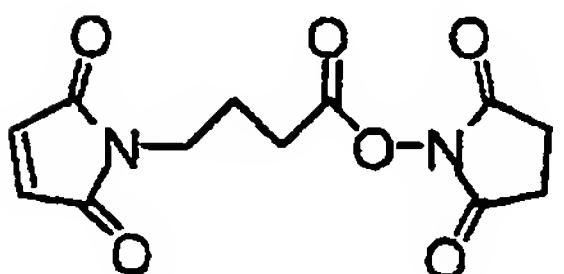
(ヘ) 2-(2-(2-ピリジルジチオ)エチル)イソシアネート

【化4】



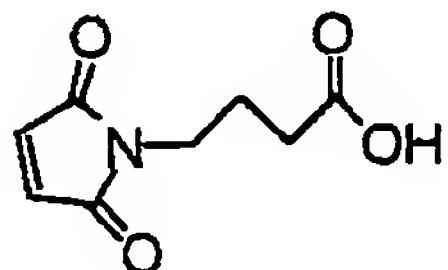
(ト) N-(4-マレイミドブチリルオキシ)スクシンイミド

【化5】



(チ) N-4-マレイミド酪酸

【化6】



【0017】

このDNAのフラグメントと二官能性リンカーとの反応は、前記の固相担体上でDNAのフラグメントに、上記の二官能性リンカーを、例えばアセトニトリルやジメチルホルムアミドのような溶液に溶かして加え、10~40℃において2~10時間かきませる。この際の溶液中の二官能性リンカーの濃度としては、0.1~1モル/リットルが好ましい。反応終了後、上記の溶剤でよく洗浄して不純物を除去する。

【0018】

次に、このようにして得たDNAのフラグメントと二官能性リンカーとの縮合生成物を固相担体上に担持したまま、これにNESペプチドを有機溶剤、例えばアセトニトリルや

ジメチルホルムアミドなどに溶解して加え、10～40℃において2～10時間かきませることによって反応させる。反応終了後、同じ溶剤で洗浄し、不純物を除くと固相担体に結合したDNAコンジュゲートが得られる。

次いで、アルカリで処理し固相担体から脱離させ、クロマトグラフなどにより精製すれば、所望の細胞質局在化DNAが2～50%の収率で得られる。

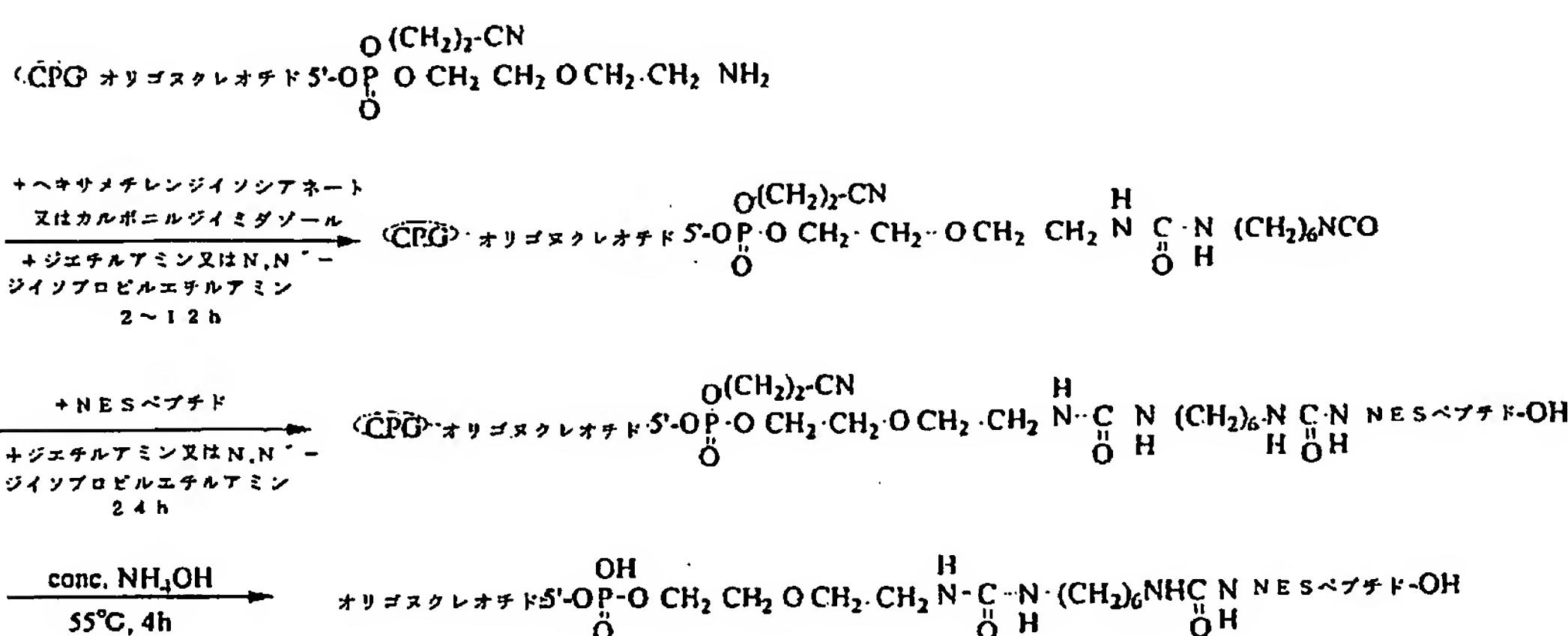
### 【0019】

この際用いるアルカリとしては、濃アンモニア水又は0.5M炭酸ナトリウム水溶液が好ましい。

### 【0020】

次に、DNAの5'-位置をNESペプチドで修飾する方法の1例の反応式を示す。

### 【化7】



(ただし式中のCPGは制御多孔性ガラスである)

この例ではオリゴペプチドの5'-位置を修飾したが、DNAフラグメントの5'-位置で固相担体に結合させれば同様にして3'-位置の修飾も行うことができる。

### 【0021】

このようにして得た細胞質局在化DNAの細胞導入性は、オリゴペプチドのN末端にフルオレセインイソチオシアネートなどを用いて蛍光ラベル化したのち、所定の細胞に導入し、培養し、フローサイトメトリー及び共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて確認することができる。

### 【発明の効果】

### 【0022】

本発明の細胞質局在化DNAは、従来の修飾DNAに比べ、細胞導入性や細胞質局在化が優れているほか、分解酵素耐性、テロメラーゼ活性阻害及びチロシンキナーゼ活性阻害も天然ペプチドに比べて高いという利点がある。この結果、細胞質に存在するチロシンキナーゼに対するアンチセンス効果が細胞内での細胞質局在化性と高い相互関係を有することが示唆された。

### 【発明を実施するための最良の形態】

### 【0023】

次に、実施例により本発明を実施するための最良の形態を説明する。

なお、各例中の細胞質局在化性、酵素分解耐性、血清中分解耐性、テロメラーゼ阻害活性及びチロシンキナーゼ活性阻害は次のようにして評価したものである。

### 【0024】

#### (1) 細胞質局在化性；

蛍光ラベル化した修飾DNAを、生理食塩水に1μMの濃度に懸濁させて試料を調製する。別に白血病細胞(Jurkat)を、標準栄養培地中に10<sup>6</sup>cells/mlの濃度で加え、上記の修飾DNA懸濁液を添加したのち、5%CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で24時間培養した。培養後、細胞を遠心分離し、PBS(-)緩衝液で3回洗浄したものについて

てフローサイトメトリー [ベックマンコルター (BECKMAN COULTER) 社製、製品記号「エピクス (E p i c s) XL」] 及び共焦点レーザー蛍光顕微鏡 [バイオラッド (B I O - R A D) 社製、製品記号「ラディアンス (R a d i a n c e) 2 0 0 0 」] を用いて評価した。

#### 【0025】

##### (2) 酵素分解耐性；

修飾DNAを濃度 $1\ \mu M$ で含む栄養培地に、酸素 (DNase 1) 100 unitを添加し、37℃において10分間培養後、RP-HPLCで分析し、修飾DNAの分解率を求めた。

#### 【0026】

##### (3) 血清中分解耐性；

栄養培地中に $1\ \mu M$ 濃度の修飾DNAと、10%濃度のウシ胎児血清 (F B S) を加え、37℃において、2時間培養後、RP-HPLCにより分析し、修飾DNAの分解率を求めた。

#### 【0027】

##### (4) テロメラーゼ阻害活性；

白血病細胞 (J u r k a t) を、 $1 \times 10^6$  cell / ml 濃度で含むRPMI培地中に修飾DNAを $1\ \mu M$ 濃度で加え、5%CO<sub>2</sub>、37℃の条件下、37℃において48時間培養したのち、TRAPアッセイ法によりテロメラーゼ活性阻害性をIC<sub>50</sub> (nM) として求めた。

#### 【0028】

##### (5) チロシンキナーゼ活性阻害；

白血病細胞K-562を用い、プロテインチロシンキナーゼアッセイ法により細胞濃度 $1 \times 10^6$  cell / ml 中に試料を $5\ \mu M$ の濃度で加え、5%CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で48時間培養したのち、その阻害率を求めた。

#### 【実施例1】

#### 【0029】

DNA自動合成機 (クルアケム社製、製品名「P S 2 5 0」) を用い、常法に従いCPG担体上でオリゴヌクレオチドH I V-1 Rev (5'-TTTTTCTCTCTCTCTCT-3') の5'末端をO-アミノエトキシエチル-O'-シアノエチルリン酸エステル残基で化学修飾した。

#### 【0030】

次いで、ヘキサメチレンジイソシアナートをアセトニトリルに溶かして調製した0.5モル濃度溶液を加え、20℃において5時間反応させたのち、アミノ酸側鎖を保護したフリーハミノ基をもつペプチドフラグメントH I V-1 Rev (配列表配列番号1) を反応させることにより、オリゴヌクレオチドの5'末端にヘキサメチレンジイソシアナートを介してNESペプチドを結合させた。

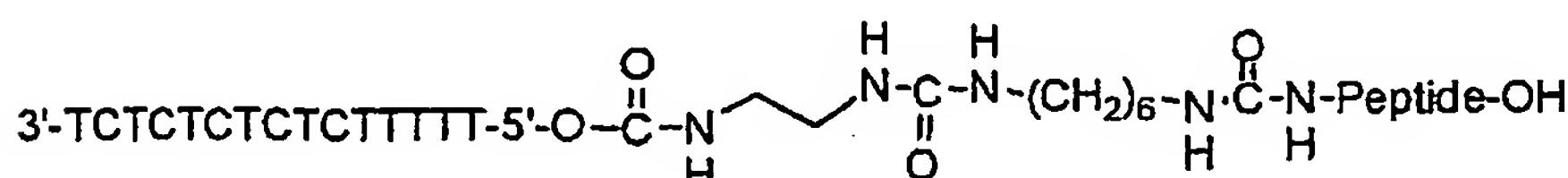
#### 【0031】

次に、この反応生成物に28%濃度のアンモニア水を加え、55℃において5時間かきまぜることにより、固相担体からの生成コンジュゲートの切り出しと同時にペプチドからの保護基の脱離を行った。

#### 【0032】

このようにして、式

#### 【化8】



で表わされる細胞質局在化DNAが収率10.7%で得られた。

#### 【0033】

このようにして得た細胞質局在化DNAの酵素分解耐性は29.1%、血清中分解耐性は42.3%、テロメラーゼ阻害活性は120nM、チロシンキナーゼ活性阻害は約50%であった。また対照の原料DNAの酵素分解耐性は49.2%、血清中分解耐性は56.9%、テロメラーゼ阻害活性は40nM、チロシンキナーゼ活性阻害は約25%であった。また、細胞質局在化DNAと相補的なDNA又はRNAとの間の融解熱は、対照の原料DNAの融解点とほぼ同じであった。

#### 【0034】

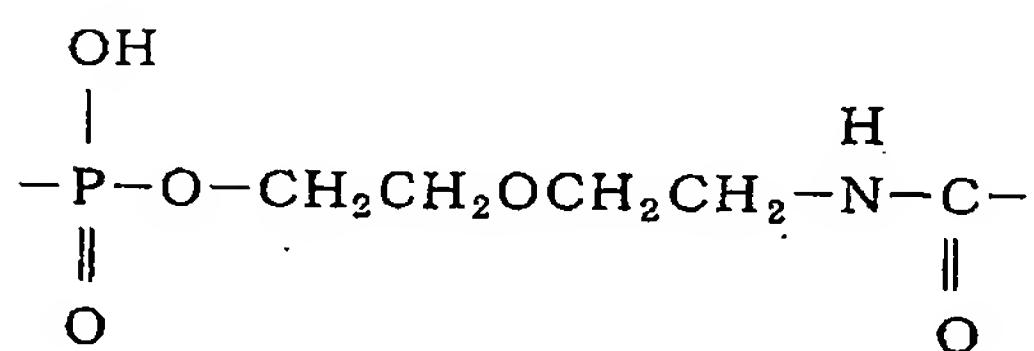
次に、このようにして得た細胞質局在化DNAをアセトニトリルに溶かし、同モル量のフルオレセインイソチオシアネート (fluorescein isothiocyanate) を加え、反応させることにより、蛍光ラベル化した。

この蛍光ラベル化した細胞質局在化DNAの細胞質局在化性を示す顕微鏡写真 (A) を、対照の蛍光ラベル化した原料DNAの顕微鏡写真 (B) と共に図1に示す。

#### 【実施例2】

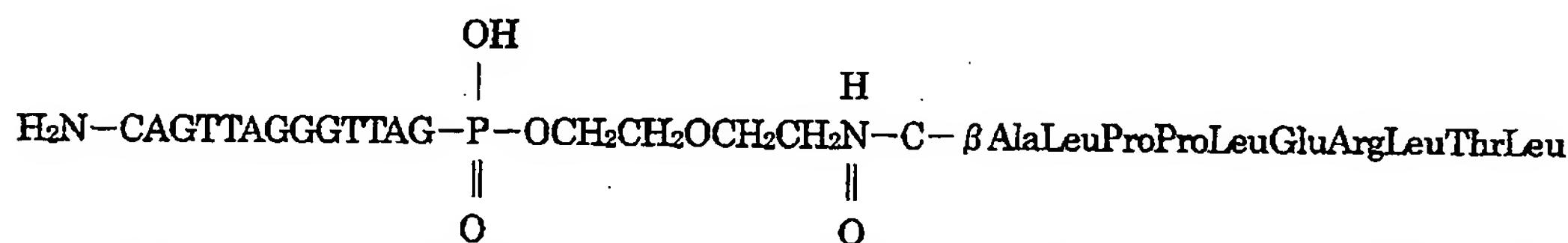
#### 【0035】

DNAとして5'-CAGTTAGGGTTAG-3'を用い、リンカーとして式  
【化9】



で表わされる残基を介してNESペプチドを導入した以外は実施例1と同様にして、式

#### 【化10】



で表わされる細胞質局在化DNAを2.7%の収率で得た。このものの酵素分解耐性は29.1%、血清中分解特性は42.3%、テロメラーゼ阻害活性は細胞溶解液を用いた系で120nMであった。また細胞系においては、約12%のテロメラーゼ活性阻害が確認された。

#### 【0036】

対照の原料DNAの非細胞系でのテロメラーゼ阻害活性は400nM以上であり、細胞系では0%のテロメラーゼ活性阻害が認められた。

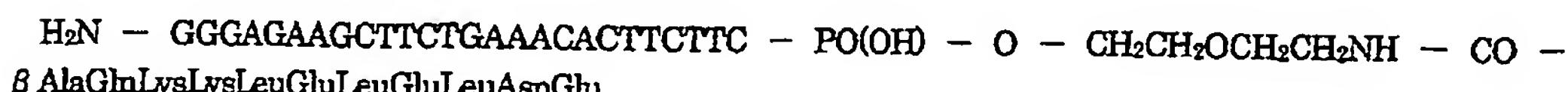
次にこれを実施例1と同様にして蛍光ラベル化して、細胞質局在化性を調べた。その結果を図2に示す。

#### 【実施例3】

#### 【0037】

DNAとして5'-GGGAGAACGTTCTGAAACACTTCTTC-3'を用い、NESペプチドとしてMAPKK(配列表配列番号4)を用いること以外は実施例2と同様にして式

#### 【化11】



で表わされる細胞質内局在化NESペプチド修飾DNAを得た。

#### 【0038】

このものの酵素分解耐性は34.2%、血清中分解耐性は41.4%、チロシンキナーゼ活性阻害は約46.2%であった。なお対照の原料DNAの酵素分解耐性は49.2%、血清中分解耐性は56.9%、チロシンキナーゼ活性阻害は約21.8%であった。

#### 【0039】

次に、この細胞質局在化NESペプチド修飾DNAを実施例1と同様にして蛍光ラベル化し、その細胞質局在化性を調べた結果を図3(A)に示す。また比較のために原料DNAの細胞質局在化性を調べた結果を図3(B)に示す。

これらを対比することにより本発明のNESペプチド修飾DNAは、細胞質局在化性を示し、また原料DNAよりも優れた酵素分解耐性、血清中分解耐性及びテロメラーゼ阻害活性を有することが分る。

#### 【0040】

##### 比較例

実施例1におけるNESペプチドHIV-1 Revの代わりにNLSペプチドSV40 T antigen(配列表配列番号5)を用いて、同様に操作して修飾したDNAを蛍光ラベル化し、その細胞質局在化性を調べたところ、その顕微鏡写真は原料DNAのそれと全く同じであり、細胞質局在化性は認められなかった。

##### 【産業上の利用可能性】

#### 【0041】

本発明によれば、遺伝子医薬の効力を向上させることができるので、医薬分野においての利用性が高い。

##### 【図面の簡単な説明】

#### 【0042】

【図1】実施例1において蛍光ラベル化した細胞質局在化DNAの細胞質局在化性を示す顕微鏡写真及び原料DNAの顕微鏡写真。

【図2】実施例2において蛍光ラベル化した細胞質局在化DNAの細胞質局在化性を示す顕微鏡写真及び原料DNAの顕微鏡写真。

【図3】実施例3において蛍光ラベル化した細胞質内局在化NESペプチド修飾DNAの細胞質局在化性を示す顕微鏡写真及び原料DNAの顕微鏡写真。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110>National Institute of Advanced Industrial Science and Technology;  
Kinki University;Kitakyushu Foundation for the Advancement of Industry  
Science and Technology

<120>Cytoplasm localized DNA and the method for preparation thereof

<130>2004001540

<160>5

<210>1

<211>10

<212>PRT

<213>HIV-1 Rev

<400>1

Ala Leu Pro Pro Leu Glu Arg Leu Thr Leu  
1 5 10

<210>2

<211>10

<212>PRT

<213>PKI  $\alpha$

<400>2

Leu Ala Leu Lys Leu Ala Gly Leu Asp Ile  
1 5 10

<210>3

<211>13

<212>PRT

<213>DSk-1

<400>3

Ser Leu Glu Gly Ala Val Ser Glu Ile Ser Leu Arg Asp  
1 5 10 13

<210>4

<211>12

<212>PRT

<213>MAPKK

<400>4

Ala Gln Lys Lys Leu Glu Glu Leu Glu Asp Glu  
1 5 10 12

<210>5

<211>7

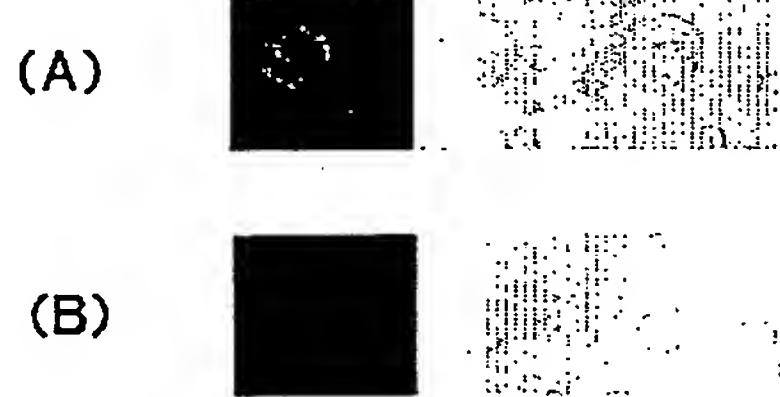
<212>PRT

<213>SV40T antigen

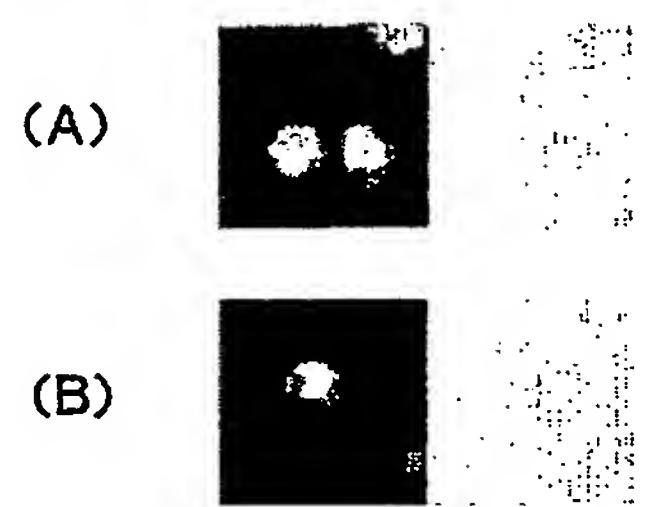
<400>5

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val  
1 5 7

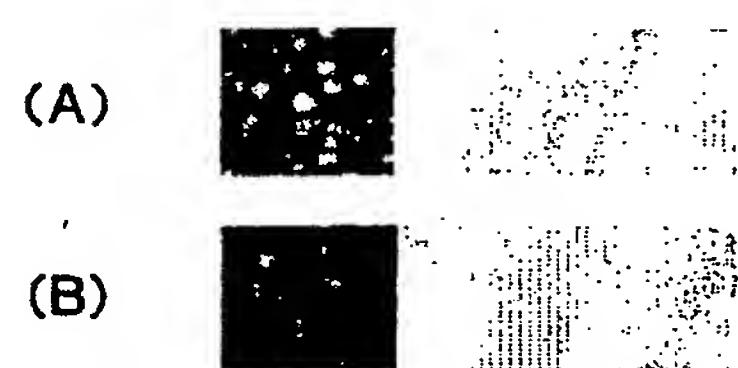
【書類名】 図面  
【図1】



【図2】



【図3】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 由来する組織に関係なく、各種DNAに対して普遍的に適用することができる手段で、細胞質局在化を実現した修飾DNAを提供する。

【解決手段】 核外移行シグナルペプチドで修飾された細胞質局在化DNAであって、固相担体上において、DNAのフラグメントを活性水素含有基で修飾し、これに二官能性リンカーを介して活性水素含有基をもつ核外移行シグナルペプチドを縮合させたのち、固相担体から脱離させることにより製造する。

【選択図】 なし

特願 2004-045488

出願人履歴情報

識別番号 [301021533]

1. 変更年月日 2001年 4月 2日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 東京都千代田区霞が関 1-3-1  
氏 名 独立行政法人産業技術総合研究所

特願 2004-045488

出願人履歴情報

識別番号 [000125347]

1. 変更年月日 1990年 8月 8日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府東大阪市小若江3丁目4番1号

氏 名 学校法人近畿大学

特願 2004-045488

出願人履歴情報

識別番号 [802000031]

1. 変更年月日 2002年 4月19日

[変更理由] 新規登録

住 所 福岡県北九州市若松区ひびきの2番1号  
氏 名 財団法人北九州産業学術推進機構